

Исследование условий выделения и получения коллагена в растворимой форме позволяет выяснить условия возникновения его надмолекулярной структуры и охарактеризовать сложные уровни структурной организации этого белка.

Большинство исследований, связанных с выделением коллагена, проводилось с применением слабых растворов кислот и в основном из тканей молодых животных, содержащих небольшое количество жира. Выделению коллагена из тканей обычно предшествует предварительная экстракция альбуминов и глобулинов растворами солей.

Недостатком известных методов выделения коллагена является, как показали наши опыты, трудность успешного применения их к тканям взрослых животных, содержащих в своем составе жир. Нами был модифицирован метод выделения коллагена, разработанный ранее /1-5/.

В опытах использовали шкуру крупной белой породы свиньи в возрасте 6 месяцев. Образцы для исследования отбирали в области кожного покрова, прилегающей к лопатке. Дериваты кожи и прирезы жира удаляли механическим путем. Далее 60 г ткани измельчали и обезжиривали по методу Кельман и Лясковской /6/. Обезжиренную дерму выдерживали в течение суток в 5-кратном объеме дистиллированной воды. Для освобождения ее от альбуминов и глобулинов проводили 36-часовую экстракцию 5-кратным объемом 0,3 М  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , промывали от выпавших кристаллов соли четыре раза 5-кратным объемом дистиллированной воды. Далее ткань помещали на 24 часа в 1,5%-ный раствор ортофосфорной кислоты (вес/объем 1:3). За исключением обезжиривания все операции проводили при температуре 3-4°C. Набухшие кусочки ткани извлекали из кислоты и замораживали в течение 24 час. в воздушной среде при температуре минус 10-12°C. После дефростации их на воздухе в течение 2-4 час. при температуре 18-20°C экстрагировали коллаген дистиллированной водой (вес/объем 1:0,5) в течение 4 час., повышая температуру с 25 до 35°C; величина pH водной вытяжки из ткани, подвергавшейся экстракции - 3,2. Профильтровав экстракт через стеклянный фильтр под разрежением, часть раствора после диализа против дистиллированной воды при температуре 2-4°C в течение 36 час. высушивали при комнатной температуре в сушильном шкафу с принудительной циркуляцией воздуха. Высушенный коллаген подвергали аминокислотному анализу на аминокислотном анализаторе "Хитачи".

Оставшуюся часть раствора исследовали методами световой и электронной микроскопии. Каплю раствора коллагена наносили на предметное стекло и с помощью шлифовального покровного стекла делали мазок, который при обезвоживании в ацетоне давал тонкую пленку. Приготовленный таким образом гистологический препарат окрашивали по методу Ван-Гизона и 1%-ным раствором фосфорномолибденовой кислоты.

Препараты для электронномикроскопического исследования готовили следующим образом: на опорные медные сетки, покрытые пленкой-подложкой с помощью тонкой пипетки наносили каплю раствора коллагена и высушивали на воздухе. Оттенивание проводилось испарением сплава платина-палладий под углом  $\sim 10^\circ$ . Объекты исследовали на электронном микроскопе УЭМВ-100В.

Отличительной особенностью метода выделения коллагена является то, что для более интенсивной деструкции волокнистой структуры животную ткань, набухшую в слабом растворе электролита, замораживают в воздушной среде при температуре минус  $10-12^\circ\text{C}$ .

Для максимального набухания ткани предпочтительно использовать 0,46 н раствор ортофосфорной кислоты.

Наступившая в результате замораживания набухшей ткани деструкция волокон способствует увеличению количества выделяемого коллагена. При однократной экстракции в течение 4 час. выход коллагена составил 0,55% от массы исходной ткани.

Предлагаемый метод наряду с выделением коллагена позволяет, используя найденные условия, осуществить реконституцию его фибрилл.

При выбранных нами условиях на процесс фибриллообразования большое влияние оказывает pH и температура. При повышении температуры выше  $35^\circ\text{C}$  и смещении pH в нейтральную область фибриллообразование не происходит. Так как реконституция фибрилл весьма чувствительна к pH, то можно предположить, что в самосборке надмолекулярной структуры белка участвуют силы электростатического взаимодействия.

Зависимость образования фибрилл от температуры характеризует вклад водородных связей в этот процесс, так как повышение температуры ослабляет водородные связи.

Основываясь на данных (табл.) аминокислотного анализа, можно



предположить, что в межмолекулярных связях при фибриллообразовании могут участвовать гуанидинная группа аргинина, карбоксильные группы дикарбоновых аминокислот: аспарагиновой и глутаминовой; гидроксильные группы треонина, серина, метилтиогруппа метионина.

Сопоставление аминокислотного состава коллагена и желатина, выделенных из свиной шкуры, показывает, что они близки по качественному составу.

Т а б л и ц а

Аминокислотный состав коллагена и желатина, выделенных из свиной шкуры

А м и н о к и с л о т ы	Количество аминокислот, г на 100 г белка	
	коллаген	желатин
Л и з и н	5,15	5,00
Г и с т и д и н	0,73	—
А р г и н и н	9,50	13,38
Аспарагиновая кислота	7,75	9,84
Т р е о н и н	2,83	4,00
С е р и н	4,74	6,27
Глутаминовая кислота	12,78	16,26
П р о л и н	9,07	10,49
Г л и ц и н	21,56	14,12
А л а н и н	11,49	6,26
В а л и н	3,68	4,24
М е т и о н и н	0,34	0,74
И з о л е й ц и н	1,93	2,00
Л е й ц и н	4,78	4,92
Т и р о з и н	1,21	1,02
Ф е н и л а л а н и н	3,46	3,47

При исследовании коллагена с помощью светового микроскопа можно было видеть сформированные пучки волокон со средним диаметром 20 мкм.

Электронномикроскопическое исследование показало наличие фибрилл с хорошо выраженной, характерной для нативного коллагена поперечной исчерченностью с периодом в 64 нм.

Фибриллы имеют удлиненную форму, достигая в отдельных случаях длины десятков микрон; толщина фибрилл составляет 100 нм (рисунок).



Рис. Фибрилла коллагена, выделенная кислотнo-криолитическим методом. Увеличение в 36000 раз.

Таким образом, специфическое окрашивание пучков коллагеновых волокон при световой микроскопии и характерная электронномикроскопическая картина поперечной исчерченности фибрилл указывают на возможность реконституции выделенного в раствор коллагена в фибриллы нативного типа после кислотнo-криолитической деструкции волокнистой структуры ткани.

Fig. Collagen fibril isolated acid-cryolytically. Magnified by 36.00 times.

ЛИТЕРАТУРА

1. Орехович В.Н., Тустановский А.А., Орехович К.Д., Плотникова Н.Е. "Биохимия", 13, 1, 1948.
2. Орехович В.Н. О превращении коллагена в проколлаген. Сообщ. и доклады на III Международном биохимическом конгрессе. Брюссель, август 1955. Изд-во АН СССР, М., 1955.
3. Мазуров В.И., Орехович В.Н. "Биохимия", 24, 1, 1959; 25, 5, 1960.
4. Орехович В.Н., Шпикитер В.О. Украинский біохімічний журнал, 5, 1965.
5. Орехович В.Н., Пондякова В.Н., Устюжанинова Н.В. "Биохимия", 33, 2, 1968.
6. Кельман Л., Лясковская Ю. "Мяси.индустр.СССР", т. 1965.

Table

Amino acid composition of collagen and gelatin isolated from pork skin

Amino acids	Amino acid contents, g/100 g protein	
	collagen	gelatin
L y s i n e	5.15	5.00
H i s t i d i n e	0.73	-
A r g i n i n e	9.50	13.38
A s p a r t i c a c i d	7.75	9.84
T h r e o n i n e	2.83	4.00
S e r i n e	4.74	6.27
G l u t a m i c a c i d	12.78	16.26
P r o l i n e	9.07	10.49
G l y c i n e	21.56	14.12
A l a n i n e	11.49	6.26
V a l i n e	3.68	4.24
M e t h i o n i n e	0.34	0.74
I s o - l e u c i n e	1.93	2.00
L e u c i n e	4.78	4.92
T y r o s i n e	1.21	1.02
P h e n y l a l a n i n e	3.46	3.47